

Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis.

Roxana Beaz Hidalgo¹, Jesús L. Romalde², Susana Prado²

¹Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Reus.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS, Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

e-mail: roxana.beaz@urv.cat

Resumen

Algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60, sin embargo son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en especies de bivalvos distintos de la ostra plana (*Ostrea edulis*) o americana (*Crassostrea virginica*). Debido a los sucesivos episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la microbiota asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos limitantes para el cultivo de este molusco bivalvo.

Los muestreos realizados a lo largo de 18 meses en 4 zonas geográficas distintas de Galicia demostraron una variación estacional en la carga bacteriana de las poblaciones de almeja cultivada (*Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*). Como era de esperar se observó un claro incremento en los niveles de bacterias totales y de vibrios en los meses más cálidos. Se aislaron un total de 768 vibrios. La caracterización bioquímica y fisiológica permitió una identificación preliminar de los aislados, agrupados en diversos fenones según sus perfiles. Los datos fenotípicos revelaron una gran diversidad de especies dentro del género, aunque hubo una clara dominancia de aislados del grupo *V. splendidus* constituyendo el 54% del total de las cepas. Otras especies abundantes fueron *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*. Se seleccionaron 145 aislados representativos de los grupos fenotípicos para obtener una identificación más exacta mediante una caracterización molecular. La técnica de polimorfismos de amplificación del DNA (AFLP) reveló la presencia de diversidad específica y permitió esclarecer la identificación de muchos aislados que estaban enmascarados en el grupo de *V. splendidus* por la identificación fenotípica. Se observó que los datos de la identificación fenotípica y genética tan sólo coincidieron en un 29,82% posiblemente debido a la gran variabilidad intraespecífica en muchas pruebas y a la falta de pruebas claras para diferenciar entre especies. Hoy se considera necesario recurrir a un sistema de clasificación e identificación bacteriana basado en datos genéticos. El 60,7% de los vibrios analizados por AFLP no lograron ser identificados a nivel de especie lo que apuntaba a la posible existencia de nuevas especies en el género. Se seleccionaron los 8 clusters no identificados de AFLP con mayor número de aislados, y se procedió a un estudio filogenético basado en la amplificación del gen 16S rRNA y cuatro genes housekeeping: *recA*, *rpOA*, *pyrH* y *atpA*. Los datos de la técnica de análisis de secuencias multilocus (MLSA) revelaron la existencia de 8 posibles nuevas especies dentro de la Familia Vibrionaceae, 6 en la rama filogenética de *V. splendidus*, 1 en la rama de *V. haliotocoli* y 1 en la rama de *Allivibrio fischeri*. Una completa descripción bioquímica, los análisis filogenéticos de los 5 genes y los datos aportados por hibridación DNA-DNA permitieron la definición de tres nuevas especies: *Vibrio breoganii* sp. nov., *Vibrio gallaecicus* sp. nov. y *Allivibrio finisterrae* sp. nov. Los análisis filogenéticos situaron a la especie *V. breoganii* en el grupo de *Vibrio haliotocoli*, siendo las especies más cercanas *Vibrio comitans*, *Vibrio rarus* y *Vibrio inusitatus*. Las células son pequeños bacilos inmóviles que carecen de flagelo. Está compuesta por 7 aislados fenotípicamente homogéneos con diferencias principalmente en la fermentación de azúcares. Los genes *atpA* y *pyrH* demostraron ser los mejores candidatos para diferenciar *V. breoganii* de las especies más cercanas. Se observó una variabilidad intraespecífica en los perfiles de ERIC-PCR, sin embargo los perfiles de REP-PCR presentaron altos porcentajes de similitud. La cepa tipo de *V. breoganii* es RD 15.11^T (= CECT 7222^T = LMG 23858^T) aislada de almeja fina (*R. decussatus*).

Los datos del MLSA situaron a la nueva especie *V. gallaecicus* dentro del grupo polifilético *V. splendidus*. La especie está compuesta por tres aislados fenotípicamente homogéneos. Todos los genes secuenciados menos el *atpA* situaron a los aislados de *V. gallaecicus* en una rama

independiente del resto de las especies del grupo. Las secuencias concatenadas de los genes situaron a *V. gallaecicus* cerca de *Vibrio chagasii*, la especie más distante del grupo. Los porcentajes de similitud en el gen 16S rRNA con las especies cercanas fueron inferiores al 97,3%. El gen *recA* es el más discriminativo para diferenciar la nueva especie de sus congéneres filogenéticos. Los tres aislados presentaron variabilidad intraespecífica en los perfiles obtenidos mediante ERIC y REP-PCR. La cepa tipo de *V. gallaecicus* es VB 8.9^T (=CECT 7244^T = LMG 24045^T) aislada de almeja japonesa.

El grupo de *Aliivibrio finisterrae* está compuesto por 4 cepas de las cuales una se diferencia claramente desde el punto de vista fenotípico, como en la prueba de hidrólisis de la urea que es negativa para esta cepa. El congénere filogenético más cercano es *Aliivibrio wodanis* con un 98,1% de similitud en el gen 16S rRNA, aunque los genes *recA* y *atpA* sitúan la especie más de cerca de *Aliivibrio fischeri* y *Aliivibrio salmonicida* respectivamente. En este caso el gen más discriminativo es el *recA*. La cepa tipo de *A. finisterrae* es CMJ 11.1^T (= CECT 7228^T = LMG 23869^T) aislada de almeja japonesa (*R. philippinarum*). En todos los casos, la técnica de MLSA y secuencias concatenadas de varios genes ofreció una mayor fiabilidad y solidez que la utilización de un solo gen para la determinación de la posición filogenética de las especies descritas. El estudio de los productos extracelulares (ECP) de 57 cepas previamente caracterizadas por AFLP demostró, en general, una baja actividad enzimática y alta variabilidad en los perfiles que no se pudieron relacionar con los clusters de AFLP. La mayor citotoxicidad en líneas celulares correspondió a cepas con ECPs con mayor actividad enzimática y concretamente proteolítica. Las cepas identificadas que mostraron mayor citotoxicidad fueron *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus* y *V. diabolicus*. En la cepa RD 8.15 (*V. splendidus*-like) de uno de los grupos mayoritarios de AFLP no identificados se detectaron actividades enzimáticas en los ECP así como una destrucción total en la línea celular de peces SAF-1 y además mostró virulencia en los ensayos de infección vía intravalvar en almeja adulta. En el análisis realizado de los ECP se observó actividad citotóxica en casi todas las cepas, sin embargo las cepas tipo de las tres nuevas especies y las 4 cepas de *Vibrio* sp. pertenecientes a los grupos de AFLP no identificados no resultaron virulentas en los ensayos realizados in vivo en larvas de almeja japonesa, ni en inoculaciones por baño en almeja adulta. El presente trabajo ha confirmado la importancia de los métodos moleculares en la identificación de especies de *Vibrio*. Los datos obtenidos por AFLP señalan la existencia de numerosas especies dentro de este género aún no descritas. Futuros estudios sobre las cepas descritas en esta memoria llevarán probablemente a la descripción de nuevas especies bacterianas dentro del género.

Palabras clave: *Vibrio*, almeja, identificación molecular, citotoxicidad, virulencia

Lecturas complementarias

1. Beaz Hidalgo, R. (2008). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja, caracterización y patogénesis». Santiago de Compostela: Universidade. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, 2008. ISBN 978-84-9887-102-9 <http://hdl.handle.net/10347/2480>
2. Beaz-Hidalgo R., Balboa, S., Romalde, J.L. y Figueras M.J. (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* 2(1): 34-43.